

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication
number:**1020000058219****A**(43)Date of publication of application:
25.09.2000(21)Application number: **1020000028977**

(71)Applicant:

(22)Date of filing: **29.05.2000****KOREA INSTITUTE OF
SCIENCE AND
TECHNOLOGY**

(72)Inventor:

**BOK, SEONG HAE
LEE, DONG SUN
JUNG, TAE SUK
CHO, HAN IK**

(51)Int. Cl

A61K 31 /35**(54) COMPOSITION FOR INHIBITING AGGLUTINATION OF PLATELET CONTAINING HESPERIDIN
OR HESPERETIN**

(57) Abstract:

PURPOSE: A composition containing hesperidin or hesperetin for inhibition of the platelet coagulation is provided, which prevents coagulation of platelets caused by exposed collagen when blood vessel endothelial cells is damaged; so which can prevents and cures formation of atheroma, or thrombosis; and which can be used in a medicine and food. CONSTITUTION: A hesperidin or hesperetin is extracted from oranges(a grapefruit, a citron, a lemon, a orange, etc) or manufactured from well-known synthetic process. A pharmaceutical composition as an inhibitor to platelet coagulation comprises of naringin or naringenin as an effective ingredient and pharmaceutically acceptable carriers, which can also contains diluents, disintegrators, sweeteners, lubricants, perfume; and which can be made in the form of tablets, capsules, powders, suspensions, emulsions, syrup, solution or parenteral preparations. A dosage of the composition for inhibition of the platelet coagulation containing naringin or naringenin is 0.5-100mg/kg, desirably 2-10mg/kg. The hesperidin or hesperetin can be added in food or beverages with same purposes.

COPYRIGHT 2000 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (20000529)

Notification date of refusal decision (00000000)

Final disposal of an application (registration)

Date of final disposal of an application (20000731)

Patent registration number (1002769790000)

Date of registration (20001005)

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. 7
A61K 31/35

(45) 공고일자 2000년12월15일
(11) 공고번호 10-0276979
(24) 등록일자 2000년10월05일

(21) 출원번호	10-2000-0028977	(65) 공개번호	특2000-0058219
(22) 출원일자	2000년05월29일	(43) 공개일자	2000년09월25일
(62) 원출원	특허 특1998-0020562 원출원일자 : 1998년06월03일	심사청구일자 : 1998년06월03일	

(73) 특허권자	한국과학기술연구원 박호군 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1
(72) 발명자	복성해 대전광역시서구삼천동가람아파트15-1202 정태숙 대전광역시유성구어은동99한빛아파트127-1103 조한익 서울특별시종로구명륜동1가36-10 이동순 서울특별시노원구중계동경남아파트1-209
(74) 대리인	오규환 장성구

심사관: 이유형

(54) 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 포함하는 혈소판 응집 억제용 조성물

요약

본 발명은 헤스페리딘(hesperidin) 또는 헤스페레틴(hesperetin)을 포함하는 혈소판 응집 억제용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 의약용 및 식품용 조성물을 포함한다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 헤스페리딘($C_{28}H_{34}O_{15}$, 분자량 610.55) 또는 헤스페레틴($C_{16}H_{14}O_6$, 분자량 302.27)을 포함하는 혈소판 응집 억제용 조성물에 관한 것으로 의약용 및 식품용 조성물을 포함한다.

보통의 상태에서 혈소판(platelet)은 혈관벽 내피(endothelium)에 잘 부착되지 않는다. 그러나 여러 가지 이유로해서 혈관벽의 내피세포(endothelial cell)들이 상처를 받고 그 밑에 있는 콜라겐이 노출되면 콜라겐에 의해 혈소판이 활성화되면서 Ca^{++} 이 방출되는데, 이렇게 되면 혈소판이 아데노신 디포스페이트(ADP), 세로토닌, 트롬복산(thromboxane) A

² 등을 방출하게 되고, 더 많은 혈소판 응집 및 혈전형성을 유도한다(Fuster V. and Verstrate M., 'Hemostasis, thrombosis, fibrinolysis, and cardiovascular Disease' in Heart Disease, Vol. 2, E. Braunwald(ed). pp

한편, 이렇게 형성된 혈전은 혈소판 응집을 더욱 촉진시키고, 동맥의 벽에 부착하여 평활근 세포, 대식세포 등이 부착하여 형성되고 있는 동맥경화의 초기 단계 증상을 촉진시켜 간접적으로 동맥경화를 촉진하며, 혈전 형성 등에 의해 혈관이 막혀서 오는 심장병을 유발하기도 한다.

작은 동맥이나 정맥에서 지혈성 플러그(hemostatic plug)의 형성에 혈소판은 가장 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 따라서 혈소판과 혈관과의 상호작용이 혈전형성의 중심부위이며, 이때 부착되는 혈소판을 억제하려는 목적으로 많은 약제가 소개되어 왔다. 뇌졸중(Cerebral stroke), 관상동맥 혈전색전증(coronary artery thromboembolism) 및 죽상(atheroma) 형성의 예방을 위해 트롬복산 A2 저해제, PGG/H 합성효소 저해제, 트롬복산 합성효소 저해제, 트롬복산 A2 수용기 길항물질, 티클로피딘(Ticlopidine), GP Hb-IHa 저해제, 세로토닌 길항물질 등의 약제들이 소개되어 있으나, 약물이 다른 장기에 미치는 부작용 및 출혈성 경향 증가로 인한 문제점을 안고 있는 실정이다.

혈전 예방 목적으로 가장 흔히 사용하는 아스피린의 경우, 심혈관 혹은 뇌혈관 질환에서 과연 사망률을 실제 낮추는가에 대해 많은 논란이 있는 상태이다. 따라서 출혈성 경향을 보이지 않고 혈전 예방을 할 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

플라보노이드 물질이 콜라겐에 의한 혈소판 응집만 특이하게 억제한다면, 일상생활에 지장을 줄수 있는 출혈성 경향을 유발시키지 않고 혈소판과 혈관내벽과의 상호작용에만 특이적으로 작용하여 혈전을 예방할 수 있다는 가능성을 기대해 볼 수 있다. 이러한 물질이 개발되면, 동맥경화증 초기의 죽상 형성방지 및 관상동맥 질환의 혈전 방지, 혈전에 의한 뇌경색 방지 등이 가능할 것이다.

죽상경화증(atherosclerosis) 환자에서 죽상경화의 주 병변은 혈장지질의 증가와 혈류역학에 의해 나타나는 죽상이다. 죽상은 지질, 혈소판, 섬유조직이 혈관내막에 축적되어 이루어진 큰 덩어리로, 큰 혈관내에 형성된 죽상으로 인해 혈관이 막히거나 혈류량이 감소하기도 하고 죽상의 일부가 떨어져 나가 주요 기관의 혈관을 폐쇄하기도 한다. 간략히 형성과정을 살펴보면, 탄력성이 떨어진 혈관의 내피세포 손상이 일어나면 그곳에 혈소판과 저밀도 지단백질(LDL)이 축적되고, 그곳으로 모여든 대식세포에서 성장인자가 분비되어 평활근세포가 원래의 위치에서 혈관 안쪽으로 이동하여 증식하게 된다.

죽상경화증 환자에서 혈중 지질을 낮추는 약제와 함께 혈소판 응집 억제 기능이 있는 약제를 함께 사용하면 죽상의 형성을 효과적으로 방지할 수 있다. 특히 혈관내피세포 손상시 노출되는 콜라겐으로 인하여 응집되는 혈소판을 방지할 수 있다면 초기 죽상형성의 개시과정을 저지시킬 수 있으므로 더욱 효과적이라 할 수 있다(Steinberg, D., 'Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis', Circulation, 76, 508(1997))

따라서 많은 연구자들은 혈소판 응집을 선택적으로 억제하는 물질을 찾아 혈전증 및 동맥경화증을 예방하고자 노력하였다. 아스피린은 시클로옥시게나제(cyclooxygenase)를 억제하여 트롬복산 A2를 억제한다. 혈소판은 ADP, 콜라겐, 트롬빈 등 많은 요소에 의해 응집되는데 아스피린은 이들의 활성을 부분적으로 억제하는 것 같다. 그러나 아스피린은 혈전예방제로서의 약효는 약한 편이다. 티클로피딘(Ticlopidin)이나 이의 화학적 유사체인 클로피도그렐(clopidogrel)은 시험관내(*in vitro*)에서는 혈소판 응집 저해작용이 없으나 생체내(*in vivo*)에서는 강력한 저해 활성을 보이고 있어 신약으로 개발되었다. 이들 물질은 특히 ADP-유도된 혈소판 응집을 선택적으로 억제하는 것으로 알려져 있으며 일시적 허혈성 뇌졸중(transient ischemic cerebral stroke)이나 말초 동맥 또는 허혈성 심질환(peripheral arterial or ischemic heart disease)에 효과가 있다고 알려져 있다(Hass, W. K. et al., N. Engl. J. Med., 21, 501(1989); 및 Easton, J. D., 'Antiplatelet therapy in the prevention of stroke', Drugs, 42, 39(1991)). 그러나 티클로피딘 등은 골수 억제(McTavish, D. et al., 'Ticlopidine: An updated review of its pharmacology and therapeutic use in platelet-dependent disorders', Drugs, 40, 238(1990)), 총 콜레스테롤의 양 증가(Hass, W. K. et al., 상기 문헌) 등의 부작용이 보고되었다. 임상실험결과, 환자의 50%에서 설사, 발진, 호중구감소증(neutropenia) 등의 부작용이 보고되었다(Dunn C. D. R., Scrip. Reports, Stroke: Trends, Treatments and Markets, PJB Publications Ltd. pp 133~139(1995)).

본 발명자들은 현재 알려진 혈소판 응집 억제제들이 선택성이 적고, 또한 부작용이 많은 것을 알고난 후, 혈관내피 세포벽의 내피층(endothelium layer)이 상할 때 노출되는 콜라겐에 의해 혈소판이 응집되는 것을 선택적으로 억제하는 유용물질을 탐색하기에 이르렀다. 보다 선택적으로 혈관벽의 지방선조(fatty streak)나 혈전(thrombus) 형성을 억제하면서도 부작용이 적은 혈류개선제, 동맥경화예방제 등을 개발하기 위하여 연구하던 중 글피에서 분리된 헤스페리딘, 헤스페레틴 등이 콜라겐에 의해 유도되는 혈소판 응집을 선택적으로 억제하는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 포함하는 혈소판 응집 억제용 의약품 및 식품 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명에서는 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 활성성분으로서 약학적으로 허용되는 담체와 함께 함유하는, 혈소판 응집 억제용 약학 조성물이 제공된다.

또한, 본 발명에서는 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 포함하는 혈소판 응집 억제용 식품조성을 및 음료 조성물이 제공된다.

본 발명의 조성물들은 혈소판 응집을 억제함과 동시에 혈전형성을 억제하여 혈류 개선에 도움이 될 수 있다.

헤스페리딘 또는 헤스페레틴은 감귤류로부터 추출되거나 공지된 합성방법에 의해서도 제조할 수 있다. 본 발명에서 감귤류란 하귤, 당유자, 감귤, 오렌지, 레몬, 자몽 또는 유자 등을 말한다. 헤스페리딘은 특히 자몽, 당유자, 유자 등에 많이 들어있다. 이들의 추출방법은 메르크 인덱스(Merck Index) 등의 문헌 및 특허 등에 다수 공개되어 있다.

헤스페리딘 또는 헤스페레틴은 콜라겐에 의해 일어나는 혈소판의 응집을 억제하므로 혈소판 응집으로 인한 동맥경화증 등의 예방 및 치료 뿐만 아니라 혈류 개선에도 효과적이다. 현재까지 연구된 독성실험결과, 헤스페리딘 또는 헤스페레틴은 1000 mg/kg의 용량으로 쥐에게 경구투여하였을 때 독성이 거의 없는 것으로 밝혀졌으며, 간을 비롯한 장기의 기능에 어떠한 부작용도 나타내지 않는다.

혈소판 응집 억제제로서, 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 유효성분으로서 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 약학적 조성물을 제조할 수 있다. 이 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 부형제, 봉해제, 감미제, 활택제, 향미제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 혼탁제, 유화제, 시럽제, 액제 또는 비경구투여용 제제와 같은 단위 투여형 또는 수회 투회형 약제학적 제제로 제형화 될 수 있다.

본 발명의 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 유효성분으로 함유하는 혈소판 응집 억제용 조성물은 목적하는 바에 따라 비경구 투여하거나 경구투여할 수 있으며, 헤스페리딘 또는 헤스페레틴이 하루에 체중 1 kg당 0.5 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 2 내지 10 mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정환자에 대한 투여 용량수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 종종도 등에 따라 변화될 수 있다.

헤스페리딘 또는 헤스페레틴은 동일한 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 건강보조식품 개발을 위하여 헤스페리딘, 헤스페레틴을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어 각종 식품류, 육류, 음료수, 초코렛, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알콜성 음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

이하 본 발명을 다음과 같은 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 다음의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이것들 만으로 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 헤스페리딘의 경구독성실험7-8 주령의 특정 병원체 부재(specific pathogens free) ICR 마우스로서 체중 25-29 g의 암컷 6마리와 체중 34-38 g의 숫컷 6 마리를 온도 $22\pm1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm5\%$, 조명 12L/12D의 동물실내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정도 순화시켰다. 실험동물용 사료((주)제일제당, 마우스 및 랫드용) 및 음수는 멸균한 후 공급하였으며 자유선크시켰다.

헤스페리딘을 0.5% 트윈 80을 용매로 하여 100 mg/ml 농도로 조제한 후, 마우스 체중 20g 당 0.2 ml씩 경구투여하였다. 시료는 1회 경구 투여하였으며 투여 후 10일 동안 다음과 같이 부작용 또는 치사 여부를 관찰하였다. 즉, 투여당일은 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 뒤에, 그리고 투여 익일부터 10일째까지는 매일 오전, 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 또한, 투여 10일째에 동물을 치사시켜 해부한 후 육안으로 내부 장기를 검사하였다. 투여당일부터 1일 간격으로 체중의 변화를 측정하여 헤스페리딘에 의한 동물의 체중 감소 현상을 관찰하였다.

본 실험은 헤스페리딘에 대하여 경구경로에서의 급성독성의 정도를 파악함으로써 일반약리 및 약효시험에서의 가용 약용량에 대한 정보를 제공하고 독성에 대한 기초 자료를 도출함을 목적으로 실시하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

급성 경구독성의 경우는 헤스페리딘 1,000 mg/kg의 약용량에서 10일동안 치사동물이 관찰되지 않았다. 10일 후 생존동물에 대한 부검을 실시한 바, 특별한 병변 육안 소견이 없었으며, 투여 익일부터 10일간 어떠한 체중의 감소 없이 정상적인 체중의 증가가 관찰되었다.

결론적으로 헤스페리딘은 상기의 농도로 경구투여시 독성이 관찰되지 않았다.

실시예 2: 헤스페리딘 및 헤스페레틴의 혈소판 응집 억제효과 1998 사람들로부터 9㎖의 혈액을 채취하여 1㎖의 3.8% 시트로산 나트륨이 포함된 용기에 채혈하였다. 위 검체를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상동액인 혈장을 취하여 혈소판 수가 200,000~400,000/mm³

3 되도록 조절하였다. 3개의 큐벳에 혈소판이 조절된 혈장 450 μl 를 넣고 37°C로 가온된 응집계(Aggrecoder)에 넣은 후 3분간 가온하였다. 이때 대조구로 사용하는 첫 번째 큐벳만 제외하고 다른 큐벳에는 시험물질로서 DMSO(dimethyl

sulfoxide)에 10 mg/l의 농도로 용해된 헤스페리딘 또는 헤스페레틴 용액을 각각 5 μ l씩 넣었다. 최종적으로 500 μ l 속에 0.05 μ g의 시험물질이 들어있다(각각 1/12 μ M 헤스페리딘, 1/6 μ M 헤스페레틴).

기준선(Base line)을 정하기 위하여 혈소판 결핍 혈장을 큐벳에 넣고 흡광도를 측정하였다. 혈소판이 풍부한 혈장이 들어있는 큐벳 3개에 응집촉진물질로서 2 mg/ml 콜라겐 50 μ l씩을 넣고 응집 반응을 일으킨 후 흡광도를 측정하였다. 또한 100 μ M ADP, 200 μ M 에피네프린 및 15 mg/ml 리스토세틴 50 μ l씩을 사용하여 상기와 동일한 과정을 반복하였다.

그 결과, 헤스페리딘 및 헤스페레틴은 콜라겐에 의해 일어나는 혈소판 응집을 억제하였다. 그러나 ADP, 에피네프린, 리스토세틴 등에 의한 응집 반응에는 영향을 주지 않았다. 따라서 헤스페리딘 및 헤스페레틴은 콜라겐에 의해 유발되는 혈소판 응집만을 선택적으로 억제함을 알 수 있으며, 이것은 기존의 약제에 비해 새로운 작용기작에 의한 반응이라 할 수 있다. 응집반응의 억제효과도 환자의 혈액에 따라 약간 달랐다. 정상적인 대조군 혈장에서는 0 ~ 20% 정도의 혈소판 응집 억제작용이 나타났고, 헤스페리딘 투여혈장에서는 59 ~ 93% 정도의 혈소판 응집억제효과가, 또한 헤스페레틴 투여 혈장에서는 15 ~ 93%의 혈소판 응집억제효과가 관찰되었다.

이상의 결과는 헤스페리딘 또는 헤스페레틴 투여가 혈액속의 혈소판 응집을 억제하는 효과가 있음을 뜻한다.

제제 예다음의 성분들을 이용하여 약학적 조성물을 제조하였다.

양(mg/캡셀) 활성성분(헤스페리딘 또는 헤스페레틴) 200 비타민 C 100 건조 전분 180 스테아르산 마그네슘 20 총 500 mg 상기 성분들을 완전히 혼합하여 총 500 mg의 양으로 경질 젤라틴 캡셀에 채움으로써 혈소판 응집을 억제하기 위한 경질 젤라틴 캡셀제를 제조하였다.

발명의 효과

헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 포함하는 조성물은 혈관 내피세포 손상시 노출되는 콜라겐으로 인한 혈소판의 응집을 방지하여 동맥경화증 초기 죽상(atheroma) 형성이나, 혈전증을 예방 및 치료할 수 있고, 독성이 없어 매우 유용한 약품 조성물 및 식품 조성물로 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항1

활성 성분으로서 유효량의 헤스페리딘 또는 헤스페레틴을 약제학적으로 혼용되는 담체와 함께 포함하는, 콜라겐에 의한 혈소판 응집 억제용 조성물.

청구항2

제1항에 있어서,

상기 헤스페리딘 또는 헤스페레틴의 유효량이 0.5 mg 내지 100 mg/kg 체중/일인 조성물.